

10/523316
10 Rec'd PCT/PTO 01 FEB 2005

INPI
INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

PCT/FR03/02412

2003

REC'D 07 NOV 2003

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

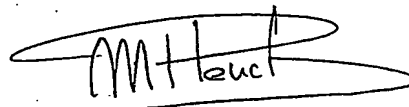
CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 11 SEP. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets



Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Important Remplir impérativement la 2ème page.

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

OB 540 W / 190600

REMISE DES PAGES DATE 2 AOUT 2002 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT 0209913 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI - 2 AOUT 2002		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET PLASSERAUD 84 rue d'Amsterdam 75440 PARIS CEDEX 09 Att. Mr. G. KOCH	
Vos références pour ce dossier (facultatif) GK/HR BFF020228			

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date <input type="text"/>
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date <input type="text"/>
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	Date <input type="text"/>
Demande de brevet initiale		N°	Date <input type="text"/>

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Solution de rinçage pour lentilles de contact	
--	--

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE	Pays ou organisation	N°
	Date <input type="text"/>	
	Pays ou organisation	N°
	Date <input type="text"/>	
Pays ou organisation N° Date <input type="text"/>		
<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»		

5 DEMANDEUR <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			
Nom ou dénomination sociale		LABORATOIRES GOEMAR S.A.	
Prénoms			
Forme juridique		Société Anonyme	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	ZAC de la Madeleine	
	Code postal et ville	35400	SAINT-MALO
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			


**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 24 JUILLET 2002 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT 0209913 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		GK/HR BFF020228	
6 MANDATAIRE			
Nom		KOCH	
Prénom		Gustave	
Cabinet ou Société		CABINET PLASSERAUD	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	84 rue d'Amsterdam	
	Code postal et ville	75009	PARIS
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01 44 63 41 11	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01 42 80 01 59	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		info@plass.com	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (<i>joindre un avis de non-imposition</i>) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (<i>joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence</i>) :	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Gustave KOCH CPI N° 92-1128		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	

Solution de rinçage pour lentilles de contact

L'invention a pour objet une solution de rinçage pour lentilles de contact.

5 Parmi les lentilles de contact que l'on trouve dans le commerce, les plus utilisées sont celles qui sont établies en des matériaux hydrophiles.

Entre deux utilisations successives, ces lentilles de contact sont rincées à l'aide de solutions notamment aqueuses qui permettent de les désinfecter ; pendant la nuit, ces lentilles sont conservées en milieu humide.

Il existe de nombreuses solutions de rinçage de ce genre.

10 De par leur caractère hydrophile, ces lentilles absorbent des quantités non négligeables de ces solutions de rinçage, notamment pendant la nuit lorsqu'elles sont conservées immergées dans ces solutions.

15 Lors de leur mise en place sur l'œil, elles amènent donc les solutions en question à la surface oculaire, au contact de laquelle elles peuvent être relarguées. Et il est évident que lorsqu'elles comportent des constituants irritants pour l'œil, le patient porteur des lentilles peut développer des intolérances telles qu'il doive abandonner l'usage des lentilles de contact.

20 Or, c'est précisément ce que l'on observe dans la pratique ; les intolérances aux lentilles de contact sont de plus en plus nombreuses et un certain pourcentage de ces intolérances est très probablement dû à la présence des constituants irritants dont il vient d'être question.

Le but de l'invention est donc surtout de remédier aux inconvénients de l'art antérieur et de mettre à la disposition de l'utilisateur une solution de rinçage pour lentilles de contact ne comportant pas de constituants irritants pour l'œil.

25 Et la Société Demanderesse a le mérite d'avoir trouvé qu'une solution répondant aux desiderata exposés ci-dessus est une solution ionique aqueuse obtenue à partir de l'eau de mer dont la composition ionique est du point de vue qualitatif celle de l'eau de mer et du point de vue quantitatif telle que d'une part son pH soit de 4 à 9, de préférence de 7 à 8 et que d'autre part son osmolalité soit de 150 à 700, de préférence de 250 à 350 mOsm/kg.

30 Plus particulièrement, il s'agit d'une solution ionique aqueuse obtenue à partir de d'eau de mer caractérisée par :

- une valeur de pH de préférence inférieure ou au plus égale aux valeurs les plus basses du pH de l'eau de mer,

- une osmolalité inférieure à celle de l'eau de mer et

- une composition du point de vue ionique qui est qualitativement et quantitativement celle de l'eau de mer, à l'exception du point de vue qualitatif, d'une part, de la concentration en potassium qui est supérieure à celle de l'eau de mer et, d'autre part, des concentrations en Na, Mg, Ca et Cl qui sont

5

inférieures à celles de l'eau de mer, lesdites concentrations étant

- o . pour Na*, de 1300 à 1500, de préférence de 500 à 1000 mg/l,
- o pour K*, de 4500 à 6500, de préférence de 5000 à 6000 mg/l,
- o pour Mg**, de 50 à 1300, de préférence de 100 à 500 mg/l,
- o pour Ca**, de 20 à 350, de préférence de 40 à 200 mg/l,
- o pour Cl*, de 4000 à 6000, de préférence de 4500 à 5000mg/l.

10

L'invention a donc pour objet une solution de lavage ophtalmique et de rinçage pour lentilles de contact caractérisé par le fait qu'elle

La solution ionique aqueuse en question, fait l'objet de la demande de brevet français n° 99 16814 déposée le 31 décembre 1999.

15

L'invention a donc pour objet l'utilisation, en tant que solution de rinçage pour lentilles de contact, de la susdite solution ionique aqueuse.

La supériorité de la solution utilisée conformément à l'invention par rapport aux solutions de rinçage pour lentilles de contact qui existent déjà a été démontré par les essais "in vitro" décrits ci-après.

20

Ces essais ont été effectués en utilisant des cellules issues d'une lignée de cellules conjonctivales humaines dite Wong Kilbourn Derwated Conjunctival Cell (WKD, ATCC 20.2).

25

Ces cellules ont été mises au contact à 100%, c'est à dire immergées, pendant au moins 15 minutes d'une part dans la solution utilisée conformément à l'invention et d'autre part dans quatre solutions de rinçage pour lentilles de contact du commerce commercialisées sous les marques de fabrique "Complete", "SoloCare", Opti Free" et "Renu" respectivement par les laboratoires Allergan, Ciba Vision, Alcon et Bausch et lomb.

30

Les effets produits sur ces cellules conjonctivales ont été évalués par différents tests désignés par "MIFALC" (Microtitration Fluorimetric Assays on live Cells) dans lesquels on utilise ce qu'on appelle des "sondes" fluorescentes appliquées directement sur des cellules vivantes adhérentes, à savoir

- le test au rouge neutre
- le test au Hoechst 33342 ou HO/Iodure de propidium ou IP

- une composition du point de vue ionique qui est qualitativement et quantitativement celle de l'eau de mer, à l'exception du point de vue qualitatif, d'une part, de la concentration en potassium qui est supérieure à celle de l'eau de mer et, d'autre part, des concentrations en Na, Mg, Ca et Cl qui sont inférieures à celles de l'eau de mer, lesdites concentrations étant

- o . pour Na^+ , de 1300 à 1500, de préférence de 500 à 1000 mg/l,
- o pour K^+ , de 4500 à 6500, de préférence de 5000 à 6000 mg/l,
- o pour Mg^{++} , de 50 à 1300, de préférence de 100 à 500 mg/l,
- o pour Ca^{++} , de 20 à 350, de préférence de 40 à 200 mg/l,
- o pour Cl^- , de 4000 à 6000, de préférence de 4500 à 5000mg/l.

La solution ionique aqueuse en question, fait l'objet de la demande de brevet français n° 99 16814 déposée le 31 décembre 1999.

L'invention a donc pour objet l'utilisation, en tant que solution de rinçage pour lentilles de contact, de la susdite solution ionique aqueuse.

La supériorité de la solution utilisée conformément à l'invention par rapport aux solutions de rinçage pour lentilles de contact qui existent déjà a été démontré par les essais "in vitro" décrits ci-après.

Ces essais ont été effectués en utilisant des cellules issues d'une lignée de cellules conjonctivales humaines dite Wong Kilbourn Derwated Conjonctival Cell (WKD, ATCC 20.2).

Ces cellules ont été mises au contact à 100%, c'est à dire immergées, pendant au moins 15 minutes d'une part dans la solution utilisée conformément à l'invention et d'autre part dans quatre solutions de rinçage pour lentilles de contact du commerce commercialisées sous les marques de fabrique "Complete", "SoloCare", Opti Free" et "Renu" respectivement par les laboratoires Allergan, Ciba Vision, Alcon et Bausch et Lomb.

Les effets produits sur ces cellules conjonctivales ont été évalués par différents tests désignés par "MIFALC" (Microtitration Fluorimetric Assays on live Cells) dans lesquels on utilise ce qu'on appelle des "sondes" fluorescentes appliquées directement sur des cellules vivantes adhérentes, à savoir

- le test au rouge neutre
- le test au Hoechst 33342 ou HO/Iodure de propidium ou IP

- le test à l'H₂DCF-DA
- le test à l'hydroéthidine
- le test à la Rhodamine 123
- le test au Nonyl Acridine Orange (NAO)

5 qui, respectivement permettent de connaître l'effet des solutions testées sur les marqueurs cellulaires suivants :

- la viabilité cellulaire,
- la condensation de la chromatine(apoptose),
- les formes réactives de l'oxygène,
- 10 - l'anion superoxyde,
- le potentiel transmembranaire mitochondrial,
- la masse mitochondriale

Les cellules Wong Kilbourn Derivated Conjunctival Cell (WKD, ATCC 20.2) sont cultivées en flasques de 75 cm² dans un incubateur thermostaté à 37°C sous
15 atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

Le milieu de culture utilisé est du DMEM enrichi à 10% en SVK, contenant 1% de glutamine et des antibiotiques, notamment de l'ampicilline/Kanamycine.

Le milieu de culture est renouvelé tous les 2-3 jours, les cellules sont trypsinées à 80% de confluence soit 1 fois par semaine en moyenne.

20 Les tests sont effectués dans des microplaques à 96 puits.

24 heures avant le traitement des cellules testées à l'aide des différentes solutions de rinçage, les microplaques 96 puits sontensemencées avec les cellules WKD à raison de 5 000 cellules par puits.

On utilise 1 plaque par test, soit 8 plaques au total.

25 Etant donné que les sondes fluorescentes émettent dans l'UV, il est nécessaire d'utiliser des microplaques spéciales à bords noirs (notamment dans le test au Hoechst 33342- Ho/IP).

24 heures après l'ensemencement, les microplaques sont traitées avec les solutions à tester.

30 L'incubation est de 15 minutes et s'effectue selon le schéma de plaque suivant comportant les colonnes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 et 12 et les lignes A, B, C, D, E, F, G, et H.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Tem	Tem	Tem	Tem	Tem	Tem	Tem	Tem	Tem	Tem	
C		Sero	Sero	Sero	Sero	Sero	Sero	Sero	Sero	Sero	Sero	
D		Comp	Comp	Comp	Comp	Comp	Comp	Comp	Comp	Comp	Comp	
E		Opti	Opti	Opti	Opti	Opti	Opti	Opti	Opti	Opti	Opti	
F		Renu	Renu	Renu	Renu	Renu	Renu	Renu	Renu	Renu	Renu	
G		Solo	Solo	Solo	Solo	Solo	Solo	Solo	Solo	Solo	Solo	
H												

dans lequel les différentes abréviations signifient :

Tem : témoin = BSS

Comp: Complete

Renu : Renu

5 Sero: Solution utilisée conformément à l'invention Opti : Optifree Solo: Solo care

Les solutions sont utilisées pures et sous conditions stériles.

L'expérimentation est renouvelée trois fois de suite avec ce même protocole.

Dans les différents tests, les effets obtenus se traduisent par une fluorescence plus ou moins intense.

10 On décrit ci-après et dans un premier temps la façon dont sont mis en œuvre les différents tests MIFALC dont il a été question plus haut.

1. Test au Rouge Neutre

15 Dans ce test, on évalue l'effet des solutions testées sur la viabilité cellulaire et l'intégrité membranaire, les résultats étant exprimés en % de fluorescence par rapport au témoin.

Ces résultats peuvent être analysés à l'aide du logiciel statistique "sigmastat32" version 2.0 (Analyse de variance et post hoc test, Test DUNNET)

20 Le test au Rouge Neutre est réalisé selon le protocole de Borenfreund (qui prévoit 50 µml/3h) ; ce protocole a été utilisé et validé dans différentes études multicentriques européennes; il est considéré comme l'un des plus sensibles pour l'évaluation de la cytotoxicité d'une substance.

Le Rouge Neutre est un colorant vital d'inclusion dont la fixation à l'intérieur des cellules est fonction de la viabilité cellulaire et de l'intégrité membranaire.

25 Il permet ainsi d'évaluer l'effet cytotoxique d'un agent chimique ou physique après 24 à 72 h, en moyenne, de contact.

L'expression du résultat se fait classiquement en pourcentage de viabilité par rapport au témoin non traité.

L'évaluation du résultat du test au Rouge Neutre est faite par détection fluorimétrique pour augmenter la spécificité de la réaction selon une procédure MiFALC (Microtitration Fluorimetric Assays on Living Cells).

La sensibilité de détection du Rouge Neutre dans ces conditions est de 50pg/ml. (Rat P et al., Cell Biol. Toxicol., 1994, 10, 329-337; Rat P. et al., Methods in Enzymology, 1995, 252, 331-340.).

2. Test au Hoechst 33342/iodure de propidium

Par ce test, on évalue la condensation de la chromatine (Apoptose), autrement dit le mécanisme de mort cellulaire

(Apoptose/Nécrose → rapport Hoechst/ Rouge Neutre)

Le "Hoechst 33342" utilisé, est une sonde spécifique de l'adénine et de la thymine, qui sont des constituants de l'ADN des cellules.

Un contre-marquage avec du iodure de propidium garantit une fixation du "Hoechst" sur des cellules normales ou seulement en apoptose, car les noyaux ou les débris d'ADN des cellules en nécrose sont colorés très rapidement par l'iodure de propidium intercalant qui empêche alors la fixation ultérieure du "Hoechst".

Une fluorescence bleue foncée est observée après fixation du "Hoechst" sur l'ADN des cellules normales.

Si le nombre de cellules normales diminue, la fluorescence du "Hoechst 33342" décroît.

Mais une condensation de la chromatine associée à un phénomène d'apoptose induit une surexpression de la fluorescence du "Hoechst" et donc une augmentation de fluorescence du signal / témoin.

On peut ainsi observer (voir figure 1), après traitement de seulement 15 minutes par la solution l'OptiFree une baisse régulière du signal.

Par contre, le signal de fluorescence reste élevé et même augmente par rapport au témoin pour les solutions SOLOCARE ET RENU.

On pourrait en déduire l'hypothèse d'un mécanisme d'apoptose dans la cytotoxicité de ces produits sur notre modèle cellulaire retenu.

L'expression du résultat se fait classiquement en pourcentage de viabilité par rapport au témoin non traité.

L'évaluation du résultat du test au Rouge Neutre est faite par détection fluorimétrique pour augmenter la spécificité de la réaction selon une procédure MiFALC
5 (Microtitration Fluorimetric Assays on Living Cells).

La sensibilité de détection du Rouge Neutre dans ces conditions est de 50pg/ml. (Rat P et al., Cell Biol. Toxicol.,1994, 10, 329-337; Rat P. et al., Methods in Enzymology,1995, 252, 331-340.).

2. Test au Hoechst 33342/iodure de propidium

10 Par ce test, on évalue la condensation de la chromatine (Apoptose), autrement dit le mécanisme de mort cellulaire

(Apoptose/Nécrose->rapport Hoechst/ Rouge Neutre)

Le "Hoechst 33342" utilisé, est une sonde spécifique de l'adénine et de la thymine, qui sont des constituants de l'ADN des cellules.

15 Un contre-marquage avec du iodure de propidium garantit une fixation du "Hoechst" sur des cellules normales ou seulement en apoptose, car les noyaux ou les débris d'ADN des cellules en nécrose sont colorés très rapidement par l'iodure de propidium intercalant qui empêche alors la fixation ultérieure du "Hoechst".

20 Une fluorescence bleue foncée est observée après fixation du "Hoechst" sur l'ADN des cellules normales.

Si le nombre de cellules normales diminue, la fluorescence du "Hoechst 33342" décroît.

25 Mais une condensation de la chromatine associée à un phénomène d'apoptose induit une surexpression de la fluorescence du "Hoechst" et donc une augmentation de fluorescence du signal / témoin.

On peut ainsi observer, après traitement de seulement 15 minutes par la solution l'OptiFree une baisse régulière du signal.

Par contre, le signal de fluorescence reste élevé et même augmente par rapport au témoin pour les solutions SOLOCARE ET RENU.

30 On pourrait en déduire l'hypothèse d'un mécanisme d'apoptose dans la cytotoxicité de ces produits sur notre modèle cellulaire retenu.

3. Test à la DCFH-DA (ou H₂DCF-DA) et à l'Hydroéthidine

Ces tests permettent d'évaluer une éventuelle production radicalaire ou plus précisément respectivement la synthèse de peroxyde d'hydrogène ou celle d'anions superoxyde.

5 Les sondes fluorogènes DCFH-DA ou hydroéthidine émettent au contact de radicaux libres (ROS, H₂O₂, anion superoxyde) une fluorescence verte.

Cette production radicalaire très labile est très sensible aux artéfacts des protocoles standards d'évaluation (trypsination, monodispersion des cellules..), d'où l'importance d'utiliser la technologie cytofluorimétrique en lumière froide (MCCM), qui
10 permet d'utiliser ces sondes directement sur des cellules vivantes adhérentes sans trypsination et sans monodispersion des cellules.

La limitation de ces artéfacts permet d'améliorer considérablement la qualité du signal et de pouvoir travailler, avec une grande sensibilité (pg-fg/ml), sur des cellules classiques (fibroblastes, ténocytes, cellules conjonctivales) qui ont un niveau radicalaire
15 base plus faible que des cellules spécialisées (macrophages ou polynucléaires en suspension) utilisées en cytométrie de flux.

Plus particulièrement, le test à la DCFH-DA permet l'évaluation des formes réactives de l'oxygène, principalement le peroxyde d'hydrogène.

La sonde H₂ DCF-DA est clivée à l'intérieur des cellules par des estérases
20 cellulaires.

Le dérivé fluorescéine formé H₂DCF n'est pas fluorescent, mais peut le devenir au contact de formes réactives de l'oxygène (par exemple du peroxyde d'hydrogène) pour former de la dichlorofluorescéine qui émet une fluorescence verte.

On peut ainsi observer une surproduction de radicaux libres en fonction du temps
25 d'incubation (15, 30, 45, 60 minutes) ou en fonction des différents produits testés.

Concernant le test à la l'HydroEthidine on notera que cette dernière, qui n'est pas fluorescente, se transforme en éthidine (*bromure d'éthidium*) fluorescente sous l'effet d'anions superoxyde.

Cette réaction spécifique de l'anion superoxyde permet de mettre en évidence le
30 rôle de ce radical dans certains mécanismes de cytotoxicité.

4. Les tests à la Rhodamine 123 et au NAO

Ces tests permettent d'évaluer l'activité et de la masse mitochondriale globale.

La mitochondrie semble être une cible précoce et privilégiée dans le mécanisme de cytotoxicité de nombreuses molécules.

Jusqu'à présent, l'évaluation de l'activité mitochondriale était délicate et nécessitait un matériel très lourd (Laser en CMF ou microélectrodes).

Les nouvelles méthodes de Microtitration Cytofluorimétrique (MCM), qui incorporent la technologie de fluorimétrie en lumière froide (MCCM), permettent l'utilisation de sondes spécifiques directement sur des cellules vivantes.

Plus particulièrement, le test à la Rhodamine 123 (Rh123) est une sonde bien connue en cytométrie en flux (*CMIF*) pour sa fixation spécifique sur la mitochondrie.

La sonde fluorescente Rhodamine 123 (Rh 123) est donc appliquée à des cellules vivantes pour évaluer les variations de l'activité mitochondriale globale suite à l'action des solutions testées.

La fluorescence de la Rhodamine 123 est proportionnelle au potentiel transmembranaire mitochondrial.

L'évaluation de la Rhodamine 123 est faite avec une détection fluorimétrique (Exc 490 nm./Em 535 nm) selon une procédure MiFALC (Microtitration Fluonmetric Assays on Living Cells).

La sensibilité de détection de la Rhodamine 123 dans ces conditions est de 20 pg/ml (Rat P *et al.*, Cell Biol. Toxicol., 1994. 10,329-3). L'interprétation des résultats nécessite l'analyse d'un test à la NAO (Nonyl Acridine Orange) associé.

5. Test au Nonyl Acridine Orange

La Nonyl Acridine Orange est une sonde fluorescente dans le rouge et dont la fluorescence est indépendante du potentiel transmembranaire.

En effet, la NAO se fixe sur le cardiolipide de la membrane mitochondriale. Plus la masse et la surface mitochondriale sont importantes plus la fixation du NAO sera importante et sa fluorescence élevée.

Lors d'un stress cellulaire, les mitochondries peuvent grossir ou diminuer en taille induisant indirectement une modification du potentiel transmembranaire mitochondrial.

Donc, l'analyse des tests Rhodamine 123 et NAO permet une évaluation fine de l'activité mitochondriale (test à la Rhodamine 123) qui peut être pondérée par les modifications de la masse mitochondriale (test NAO) suite à un stress cellulaire.

Autrement dit, elle permet d'avoir une idée précise sur l'effet produit par les solutions testées.

Ainsi que l'on vient de le voir, les tests retenues donnent lieu à des signaux de fluorescence.

Il s'agit donc d'évaluer ces signaux de fluorescence.

Pour ce faire, on a recours à une technique de Microtitration Cytofluorimétrique (MCM) incorporant la technologie de fluorimétrie en lumière froide (MCCM: Microplate Cold light Cytometry) décrite par Rat P. et al., dans *Methods in Enzymology*, 1995, 252, 331-340.

La limite de détection de cette technique est : pico-femtogramme de sonde/ml

Le spectre de détection est : 280 à 870 nm

Il est ainsi possible d'effectuer des mesures de sondes fluorescentes intracellulaires directement en microplaques sur des cellules vivantes (MIFALC tests : Microtitration Fluorimetric Assay on Living Cells)

Grâce à cette technique, il devient possible d'étudier la cytotoxicité sur des temps courts et longs ainsi que des cinétiques en continu, car la lignée cellulaire utilisée a un équipement enzymatique stable dans le temps à la différence de la primoculture ; de plus la technologie utilisée permet l'évaluation de la cinétique de fluorescence sur des cellules adhérentes.

Elle permet également d'évaluer la cytotoxicité directement sur des cellules vivantes adhérentes (tests MIFALC -Microtitration Fluorimetric Assays on Live Cells), car le fait de trypsiner ou de monodisperser les cellules pour permettre leur utilisation en immunochimie ou en cytométrie de flux induit différents artéfacts qui peuvent altérer l'observation et l'interprétation correcte de certains marqueurs labiles (par exemple des radicaux libres...).

Les cellules de l'œil sont des cellules adhérentes qui perdent certaines fonctions intracellulaires si on les sépare de leur support ou si on les dissocie l'une de l'autre.

Il est donc préférable de travailler sur des cellules vivantes adhérentes en utilisant les procédures MiFALC.

Enfin, l'utilisation d'une technologie cytofluorimétrique sur microplaques présente l'avantage d'associer la spécificité de détection des méthodes fluorimétriques, la sensibilité d'une technologie en lumière froide (pico-femtogramme/ml de sonde détectée) et la reproductibilité de méthodes sur microplaques.

L'interprétation des résultats des tests venant d'être décrits, on peut

- d'évaluer le type de mort cellulaire induit (nécrose ou apoptose),
- d'évaluer les formes radicalaires de l'oxygène (H_2O_2) induits,
- d'évaluer une éventuelle surproduction d'anion superoxyde et
- d'évaluer l'intensité de l'activité mitochondriale.

a) Evaluation du type de mort cellulaire (nécrose-apoptose)

L'association de plusieurs marqueurs fluorescents permet la mesure simultanée des mécanismes de mort cellulaire de type nécrose et apoptose.

Pour ce faire, on utilise l'association d'une sonde telle que le Rouge Neutre pour mesurer l'intégrité membranaire avec deux sondes ADN, Hoechst 33342 et Iodure de propidium, pour la mesure des mécanismes d'apoptose et de condensation de la chromatine.

La figure 1 montre les résultats cellulaires avec les principaux marqueurs testés, c'est-à-dire dans la colonne colorée en rouge, le Rouge Neutre pour la mesure de l'intégrité membranaire et la viabilité cellulaire, et dans la colonne colorée en bleu le "Hoechst 33342" pour l'évaluation de la condensation de la chromatine.

Une augmentation significative du "Hoechst" par rapport au témoin est généralement le signe d'une condensation de la chromatine lors des mécanismes d'apoptose qui est d'ailleurs confirmée par les observations au microscope en fluorescence.

On peut ainsi observer sur la figure 1 que la solution utilisée conformément à l'invention est globalement inerte et ne donne pas de cytotoxicité particulière que ce soit pour la nécrose ou l'apoptose.

Par contre, les solutions du commerces telles que le Rénu® ou le Solo care® induisent une augmentation significative de la fluorescence du "Hoechst", signe d'un stress cellulaire de type apoptose.

Pour l'Optifree®, en moins de 15 minutes, on observe une mort cellulaire de type nécrose; cette nécrose peut en fait être un mécanisme d'apopto-nécrose qui pourrait être précisé avec les tests complémentaires.

Dans le cas du produit Complete®, on observe un stress cellulaire avec augmentation des deux marqueurs dont le mécanisme pourra être précisé par les autres tests.

De ce fait, dès cette première série de tests, on observe deux groupes, d'une part la solution utilisée selon l'invention qui est globalement inerte sur les cellules conjonctivales de l'œil humain, et, d'autre part, les différents produits multifonctions du commerce pour le rinçage des lentilles de contact qui induisent toutes un stress cellulaire de type nécrose, apopto-nécrose ou apoptose.

a) Evaluation du type de mort cellulaire (nécrose-apoptose)

L'association de plusieurs marqueurs fluorescents permet la mesure simultanée des mécanismes de mort cellulaire de type nécrose et apoptose.

5 Pour ce faire, on utilise l'association d'une sonde telle que le Rouge Neutre pour mesurer l'intégrité membranaire avec deux sondes ADN, Hoechst 33342 et Iodure de propidium, pour la mesure des mécanismes d'apoptose et de condensation de la chromatine.

10 Une augmentation significative du "Hoechst" par rapport au témoin est généralement le signe d'une condensation de la chromatine lors des mécanismes d'apoptose qui est d'ailleurs confirmée par les observations au microscope en fluorescence.

On peut ainsi observer que la solution utilisée conformément à l'invention est globalement inerte et ne donne pas de cytotoxicité particulière que ce soit pour la nécrose ou l'apoptose.

15 Par contre, les solutions du commerces telles que le Rénu® ou le Solo care® induisent une augmentation significative de la fluorescence du "Hoechst", signe d'un stress cellulaire de type apoptose.

Pour l'Optifree®, en moins de 15 minutes, on observe une mort cellulaire de type 20 nécrose; cette nécrose peut en fait être un mécanisme d'apopto-nécrose qui pourrait être précisé avec les tests complémentaires.

Dans le cas du produit Complete®, on observe un stress cellulaire avec augmentation des deux marqueurs dont le mécanisme pourra être précisé par les autres tests.

25 De ce fait, dès cette première série de tests, on observe deux groupes, d'une part la solution utilisée selon l'invention qui est globalement inerte sur les cellules conjonctivales de l'œil humain, et, d'autre part, les différents produits multifonctions du commerce pour le rinçage des lentilles de contact qui induisent toutes un stress cellulaire de type nécrose, apopto-nécrose ou apoptose.

b) Evaluation des formes radicalaires de l'oxygène (1120)

Sur la figure 2, on peut observer une cinétique d'apparition des formes radicalaires de l'oxygène.

Cette cinétique correspond aux tests effectués avec la sonde H2DCF-DA, qui réagit avec les différentes formes radicalaires de l'oxygène, et particulièrement avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

On peut ainsi observer un comportement extrêmement différent entre la solution conformément à l'invention et les produits du commerce.

Après 15 minutes de contact, il n'y a pas de différence significative entre les différentes solution connues du commerce.

Il ne semble donc pas y avoir de rôle spécifique des formes radicalaires de l'oxygène dans l'induction des stress cellulaires observés précédemment (cf figure 1) sur des temps courts de 15 minutes.

Par contre, le déclenchement de ces mécanismes d'apoptose et de nécrose peut induire des modifications de la production de formes radicalaires.

Ainsi, après 60 minutes de contact, toutes les solution du commerce induisent une diminution des formes radicalaires de l'oxygène probablement liée à un effet de stress cellulaire et même à une diminution du nombre des cellules, due aux morts cellulaires observées dès les 15 premières minutes (nécrose et apoptose) vues précédemment avec les tests Rouge Neutre et "Hoechst".

Dans le cas de la solution utilisée conformément à l'invention, on observe que les cellules sont fonctionnelles et réagissent à cet agent exogène par une surproduction radicalaire (figure 2) sans induire d'altération significative de la cellule car les tests de cytotoxicité globale (tests au Rouge Neutre (figure 1) ne sont pas perturbés.

c) Evaluation d'une surproduction d'anion superoxyde

On peut observer sur la figure 3, une surproduction d'anion superoxyde suite au traitement par les différentes solutions testées.

On observe, en fait, qu'il n'y a pas de différence significative par rapport au témoin et l'on n'observe pas de surproduction d'anion superoxyde quels que soient les produits. A noter que la production d'anion superoxyde dans les cellules incubées avec la solution utilisée conformément à l'invention a tendance à être la plus faible des produits testés sans observer de différence significative au vu des écarts-types importants.

On observe donc globalement un stress cellulaire important s'orientant vers la mort cellulaire par apoptose mais sans être lié à un stress radicalaire significatif.

b) Evaluation des formes radicalaires de l'oxygène (1120)

On observe une cinétique d'apparition des formes radicalaires de l'oxygène.

Cette cinétique correspond aux tests effectués avec la sonde H2DCF-DA, qui
5 réagit avec les différentes formes radicalaires de l'oxygène, et particulièrement avec le
peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

On peut ainsi observer un comportement extrêmement différent entre la solution
conformément à l'invention et les produits du commerce.

Après 15 minutes de contact, il n'y a pas de différence significative entre les
10 différentes solution connues du commerce.

Il ne semble donc pas y avoir de rôle spécifique des formes radicalaires de
l'oxygène dans l'induction des stress cellulaires observés précédemment sur des temps
courts de 15 minutes.

Par contre, le déclenchement de ces mécanismes d'apoptose et de nécrose peut
15 induire des modifications de la production de formes radicalaires.

Ainsi, après 60 minutes de contact, toutes les solution du commerce induisent une
diminution des formes radicalaires de l'oxygène probablement liée à un effet de stress
cellulaire et même à une diminution du nombre des cellules, due aux morts cellulaires
observées dès les 15 premières minutes (nécrose et apoptose) vues précédemment avec les
20 tests Rouge Neutre et "Hoechst".

Dans le cas de la solution utilisée conformément à l'invention, on observe que les
cellules sont fonctionnelles et réagissent à cet agent exogène par une surproduction
radicalaire sans induire d'altération significative de la cellule car les tests de cytotoxicité
globale (tests au Rouge Neutre ne sont pas perturbés.

25 c) Evaluation d'une surproduction d'anion superoxyde

On observe une surproduction d'anion superoxyde suite au traitement par les
différentes solutions testées.

On observe, en fait, qu'il n'y a pas de différence significative par rapport au
témoin et l'on n'observe pas de surproduction d'anion superoxyde quels que soient les
30 produits. A noter que la production d'anion superoxyde dans les cellules incubées avec la
solution utilisée conformément à l'invention a tendance à être la plus faible des produits
testés sans observer de différence significative au vu des écarts-types importants.

On observe donc globalement un stress cellulaire important s'orientant vers la mort
cellulaire par apoptose mais sans être lié à un stress radicalaire significatif.

Des tests complémentaires sur la mitochondrie permettront d'explorer les autres voies d'induction de l'apoptose.

d) Evaluation de l'activité mitochondriale

Pour cette évaluation, on associe simultanément deux sondes fluorescentes.

5 La première de ces sondes à savoir la sonde Rhodamine 123, permet d'évaluer le potentiel transmembranaire mitochondrial, alors que la deuxième, NAO (nonyl acridine orange), permet de mesurer la masse mitochondriale.

10 On observe ainsi, après seulement 15 minutes de contact, une diminution significative du potentiel transmembranaire mitochondrial (Figure 4) pour les solutions du commerce de type Rénu® ou Solocare®.

On sait qu'une telle diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial apparaît dans des phases précoces d'apoptose qui ont été observées dès 15 minutes et est confirmée par l'apparition de la condensation de la chromatine avec les sondes telles que le "Hoechst".

15 En outre, on observe une dissociation de la masse mitochondriale et de l'activité mitochondriale pour les solutions du commerce telles que le Complete® et l'Optifree® ce qui confirme le stress cellulaire observé auparavant.

20 La solution utilisée conformément à l'invention, quant à elle, apparaît globalement inerte comparée aux autres solutions du commerce utilisées pour le rinçage des lentilles de contact.

Globalement, il apparaît donc que tous les produits du commerce induisent un stress cellulaire significatif.

25 Contrairement à la solution utilisée conformément à l'invention, le Solocare® et le Rénu~ induisent dès 15 minutes d'incubation des mécanismes d'apoptose très nets avec condensation de la chromatine et altération des fonctions mitochondriales.

Les solutions Optifree® et Complete induisent un stress cellulaire caractérisé par le déclenchement du système de compensation mitochondriale, diminution de la masse, augmentation du potentiel transmembranaire mitochondrial, qui, si le stress perdure, peuvent aboutir à des mécanismes d'apoptose-nécrose.

30 L'ensemble des constatations et conclusions qui précèdent montrent très nettement la supériorité, de par son innocuité, de la solution utilisée conformément à l'invention par rapport aux solutions déjà existantes pour le rinçage de lentilles de contact.

Et cela d'autant plus que les stress observés et décrits plus haut et qui permettent d'aboutir à ces conclusions ont été observés après seulement 15 minutes de contact avec

Des tests complémentaires sur la mitochondrie permettront d'explorer les autres voies d'induction de l'apoptose.

d) Evaluation de l'activité mitochondriale

Pour cette évaluation, on associe simultanément deux sondes fluorescentes.

5 La première de ces sondes à savoir la sonde Rhodamine 123, permet d'évaluer le potentiel transmembranaire mitochondrial, alors que la deuxième, NAO (nonyl acridine orange), permet de mesurer la masse mitochondriale.

10 On observe ainsi, après seulement 15 minutes de contact, une diminution significative du potentiel transmembranaire mitochondrial pour les solutions du commerce de type Rénu® ou Solocare®.

On sait qu'une telle diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial apparaît dans des phases précoces d'apoptose qui ont été observées dès 15 minutes et est confirmée par l'apparition de la condensation de la chromatine avec les sondes telles que le "Hoechst".

15 En outre, on observe une dissociation de la masse mitochondriale et de l'activité mitochondriale pour les solutions du commerce telles que le Complete® et l'Optifree® ce qui confirme le stress cellulaire observé auparavant.

20 La solution utilisée conformément à l'invention, quant à elle, apparaît globalement inerte comparée aux autres solutions du commerce utilisées pour le rinçage des lentilles de contact.

Globalement, il apparaît donc que tous les produits du commerce induisent un stress cellulaire significatif.

25 Contrairement à la solution utilisée conformément à l'invention, le Solocare® et le Rénu~ induisent dès 15 minutes d'incubation des mécanismes d'apoptose très nets avec condensation de la chromatine et altération des fonctions mitochondriales.

Les solutions Optifree® et Complete induisent un stress cellulaire caractérisé par le déclenchement du système de compensation mitochondriale, diminution de la masse, augmentation du potentiel transmembranaire mitochondrial, qui, si le stress perdure, peuvent aboutir à des mécanismes d'apoptose-nécrose.

30 L'ensemble des constatations et conclusions qui précèdent montrent très nettement la supériorité, de par son innocuité, de la solution utilisée conformément à l'invention par rapport aux solutions déjà existantes pour le rinçage de lentilles de contact.

Et cela d'autant plus que les stress observés et décrits plus haut et qui permettent d'aboutir à ces conclusions ont été observés après seulement 15 minutes de contact avec

les solutions en question. Or, en pratique, ces solutions peuvent s'adsorber sur la lentille lors du rinçage et être relargués pendant plusieurs heures après mise en contact avec le globe oculaire du patient.

5 Du point de vue pratique, les solutions ioniques aqueuses, pour autant qu'elles sont destinées à l'utilisation pour le rinçage des lentilles de contact peuvent être préparées comme indiqué dans la demande de brevet identifiée plus haut dans laquelle on trouvera également d'utiles précisions quant à leur propriétés.

REVENDICATIONS

1. Utilisation pour le rinçage des lentilles de contact, notamment celles établies en matériaux hydrophile, d'une solution ionique aqueuse obtenue à partir de l'eau de mer dont la composition ionique est du point de vue qualitatif celle de l'eau de mer et du point de vue quantitatif telle que d'une part son pH soit de 4 à 9, de préférence de 7 à 8 et que d'autre part son osmolalité soit de 150 à 700, de préférence de 250 à 350 mOsm/kg.

2. Utilisation pour le rinçage des lentilles de contact, notamment celles établies en matériaux hydrophile, d'une solution ionique aqueuse, caractérisée par

- une valeur de pH de préférence inférieure ou au plus égale aux valeurs les plus basses du pH de l'eau de mer,
- une osmolalité inférieure à celle de l'eau de mer et
- une composition du point de vue ionique qui est qualitativement et quantitativement celle de l'eau de mer, à l'exception du point de vue qualitatif, d'une part, de la concentration en potassium qui est supérieure à celle de l'eau de mer et, d'autre part, des concentrations en Na, Mg, Ca et Cl qui sont inférieures à celles de l'eau de mer, lesdites concentrations étant
 - o pour Na*, de 1300 à 1500, de préférence de 500 à 1000 mg/l,
 - o pour K*, de 4500 à 6500, de préférence de 5000 à 6000 mg/l,
 - o pour Mg**, de 50 à 1300, de préférence de 100 à 500 mg/l,
 - o pour Ca**, de 20 à 350, de préférence de 40 à 200 mg/l,
 - o pour Cl*, de 4000 à 6000, de préférence de 4500 à 5000mg/l.

Vos références pour ce dossier (facultatif)		GK/MAT - FR 02 09913
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02 09913
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
SOLUTION DE RINCAGE POUR LENTILLES DE CONTACT		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
LABORATOIRES GOEMAR S.A.		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	YVIN
	Prénoms	Jean-Claude
Adresse	Rue	3, rue Gabriel Desgrés
	Code postal et ville	3 1 5 1 4 1 0 1 0 Saint-Malo, France
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	LEROY
	Prénoms	Didier
Adresse	Rue	La Harmonie
	Code postal et ville	3 1 5 1 7 1 3 1 0 Pleurtuit, France
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	RAT
	Prénoms	Patrice
Adresse	Rue	7 rue Lamblardie
	Code postal et ville	7 5 1 0 1 1 2 Paris, France
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 210103

Vos références pour ce dossier (facultatif)		GK/MAT - FR 02 09913
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02 09913
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
SOLUTION DE RINCAGE POUR LENTILLES DE CONTACT		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
LABORATOIRES GOEMAR S.A.		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1 Nom	WARNET	
Prénoms	Jean-Michel	
Adresse	Rue	47 bld Suchet
	Code postal et ville	75016 Paris, France
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Paris, le 30 juillet 2003 Gustave KOCH CPI N° 92-1128		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.